

Aspergillus fumigatus IFO 5840의 Cytosine Deaminase에 미치는 Cytosine Analogue의 영향

김 재 근

계명전문대학 식품영양과

Effect of Cytosine Analogues on Cytosine Deaminase from *Aspergillus fumigatus* IFO 5840

Jae-Keun Kim

Dept. of Food and Nutrition, Keimyung Junior College, Taegu 705-037, Korea

Abstract

In this study investigated the effect of cytosine deaminase activity from *Aspergillus fumigatus* IFO 5840 by cytosine analogues. The results were as follows. The enzyme was strongly inhibited by 2-thiouracil, 2-thiocytosine, 6-azacytosine and 2-mercaptopyrimidine. The half inhibitory concentration(HIC) of 2-thiocytosine and 6-azacytosine on cytosine deaminase was 0.80mM and 1.15mM, respectively. The enzyme was inhibited at a certain level by addition of 2-thiocytosine immediately, but was maintained to some extent under the inhibited state by 6-azacytosine in proportion to reaction time. Regardless of kinds of substrate such as cytosine and 5-fluorocytosine, 2-thiocytosine and 6-azacytosine showed action as inhibitors, 2-thiocytosine inhibited cytosine deaminase activity about twice as strong as 6-azacytosine. The enzyme, when cytosine was used as a substrate, was revealed the pattern of competitive inhibition by 2-thiocytosine and 6-azacytosine. The k_i value for these compounds was $4.5 \times 10^{-4}M$ and $1.756 \times 10^{-3}M$, respectively. At this point, the Hill coefficient for cytosine, 2-thiocytosine and 6-azacytosine was 1.80, 1.81 and 2.45, respectively.

Key words : cytosine deaminase, cytosine analogues, *Aspergillus fumigatus* IFO 5840

서 론

Cytosine deaminase(cytosine aminohydrolase, EC. 3. 5. 4. 1)는 cytosine의 탄소 4번 위치에 결합된 아미노기를 가수분해에 의해 탈아미노시켜 uracil과 암모니아로 전환시키는 효소이다. 이 효소는 1923년 Hahn과 Lintzel에 의해 빵효모로부터 처음 확인되었으며¹⁾ 1925년 Hahn과 Schäfer에 의해 대장균으로부터도 확인되었다²⁾.

본 효소는 인체나 고등동물의 체내에는 존재하지 않으므로 고등 동물체 내에서의 cytidyl산의 대사는 nucleoside level에서 촉매·대사되며³⁾ 인체 내에서의 cytosine은 분해되거나 재합성되지 못하고 체외로 직접 배설된다^{4, 5)}.

H₂O를 acceptor로 하는 nucleoside hydrolase에 의해 생성된 ribose는 phosphate를 acceptor로 하는

nucleoside phosphorylase에 의해 생성된 ribose-1-phosphate보다 고에너지 인산화 반응이 요구되므로 nucleoside hydrolase는 진화가 늦게 일어나는 하등세균에 편재되어 있다는 연구도 있으며⁶⁾ nucleoside hydrolase가 존재하면 자연적으로 다음 대사를 촉매하는 효소, cytosine deaminase의 존재가 불가피하여지며 nucleoside phosphorylase가 존재하는 생물에서는 nucleoside phosphorylase의 기질이 될 수 있는 uridine을 생성하기 위해 cytidine deaminase의 존재가 필요 불가결하게 된다고 추론하고 있다⁶⁾.

이와 같이 cytosine deaminase는 nucleoside hydrolase에 의해 촉매되어 생성된 cytosine의 대사에 중요한 key enzyme으로서 세균 진화와의 관련성이 검토되고 있으며^{7, 8)} 항중양 보조제로서 임상학적인 연구도 활발히 이루어지고 있다^{9~11)}.

Cytosine deaminase는 효모^{12, 13)}, 세균^{14~24)}과 같은

단세포 미생물을 대상으로 주로 연구되어 오다가 다소 생분진화가 진행된 곰팡이에서도 발견되어 일련의 연구가 진행되고 있다^{25, 26)}.

더욱이 *Aspergillus fumigatus* IFO 5840이 생산하는 cytosine deaminase의 효소학적 성질 등²⁷⁾이 규정되어 있을 뿐, 본 효소에 관한 활성저해 mechanism에 관한 연구는 전무하며 단지, Cihak 등^{28, 29)}은 *E. coli*를 대상으로, Kream 등¹²⁾은 빵효모를 대상으로 하여 cytosine deaminase 활성 저해물질을 검토한 결과, *E. coli*의 cytosine deaminase의 저해는 5-azacytosine에 의해, 빵효모의 cytosine deaminase의 저해는 isocytosine과 2-mercapto-6-aminopyrimidine에 의해 각각 저해되었다는 보고가 있을 뿐, 곰팡이에 대한 보고는 없다.

따라서 본 연구에서는 곰팡이가 생산하는 cytosine deaminase 효소활성 저해를 규명하기 위하여 cytosine analogue에 의한 영향 및 50% 활성저해 농도, 시간별 효소활성 변화, 기질별 저해제의 영향, 저해 양상, 저해 계수(K_i) 및 Hill 계수(Hn) 등을 검토하였던 바 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 사용균주 및 배양방법

Cytosine deaminase를 생성하는 *Aspergillus fumigatus* IFO 5840의 증식용 배지는 2% 포도당, 1% 효모 추출물 및 0.1% peptone의 조성을 갖는 배지 (pH 5.6)를 사용했다. 균배양은 상기의 배지 100ml를 넣은 진탕 플라스크에 종배양 균체 0.5g씩을 첨가하여 30°C에서 22시간 진탕배양(120 strokes/min, 진폭 5cm)하였다. 종균배양은 500ml 진탕 플라스크에 100ml의 상기 조성의 배지를 넣어 1백금이 접종 후 28°C에서 3일간 진탕배양시킨 배양액 10ml를 살균된 pipette으로 100ml의 동일 액체배지에 접종하여 30°C에서 36시간 배양하므로 충분히 포자를 형성시킨 다음 흡인여과하여 균체를 모아 증류수로 3회 이상 세척하여 냉동 보관하였다.

2. 효소액 조제

1) 조효소액의 조제

흡인여과하여 집균한 균체 40g에 1mM 2-mercaptoethanol을 함유한 0.02M Tris-HCl 완충액 (pH 6.5) 90ml와 160g의 glass bead(ϕ 0.3~0.5mm)를 넣고 Ace homogenizer로 16,000rpm에서 10분간 파쇄

한 다음 10,000rpm에서 30분간 원심분리(Beckman model J2-21)하여 얻은 상등액을 조효소액으로 하였다.

2) 유안 침전 분획

조효소액에 유안을 첨가하여 35%로 포화시켜 3시간 정치후 10,000rpm, 30분간 원심분리하여 침전물은 제거하고 그 상등액에 다시 유안을 60%로 포화시켜 5시간 방치후 상기방법과 같이 원심분리하여 침전된 효소 단백질은 1mM mercaptoethanol을 함유한 0.02M Tris-HCl완충액 (pH 6.5)에 용해시켜 효소액 20배량의 상기 완충액으로 3회 교환하면서 5°C에서 10시간 투석시켰다.

3) DEAE-cellulose column chromatography

상기 완충액으로 평형화시킨 DEAE-cellulose column(1.5 × 18.5cm)으로 행했다. 충분히 투석한 효소액을 DEAE-cellulose column에 충전시켜 상기 완충액으로 비활성 단백질을 씻어낸 후 1mM mercaptoethanol과 0.3M NaCl을 함유한 0.05M Tris-HCl완충액 (pH 6.5)으로 씻어 활성 단백질 분획을 얻었다. 효소 단백질분획은 투석막에 넣어 냉풍에 의하여 농축시켜 투석하지 않고 gel여과시켰다. Elution 조건은 14.4 ml/hr의 유속으로 4.2ml씩 분획했다.

4) Sephadex G-100 column chromatography

공정(Ⅲ)의 농축 효소액을 1mM 2-mercaptoethanol을 함유한 0.02M Tris-HCl완충액 (pH 6.5)으로 평형화시킨 Sephadex G-100 column(1.6×51.7cm)에 충전시켜 상기 완충액으로 elution 시켰다. Elution 조건은 drop당 50초의 유속으로 4.2ml씩 분획했다. 이상의 정제 공정에 의해 수율 12.6%를 얻었다.

3. 효소 활성 측정

Cytosine deaminase에 미치는 cytosine analogue의 영향을 조사하기 위하여 산성조건하에서 cytosine과 uracil이 갖는 흡광도의 차이를 이용한 Sakai 등의 방법^{14, 15)}을 조금 변화시켜 사용하였다. 효소 반응계는 5mM cytosine용액 0.2ml, 부분정제 효소액 0.1ml 및 적당한 양의 0.05M Tris-HCl완충액 (pH 6.5)과 5mM의 각종 cytosine analogue용액을 섞은 효소 반응액 1ml를 37°C 진탕수조(100 strokes/min, amplitude 2.5cm)에서 30분간 효소 반응시킨 후 0.1N HCl 4ml를 첨가하여 반응을 정지시키고 효소반응 전후에서의 290nm의 흡광도의 감소를 측정하였다. 이 때 5-fl-

uorocytosine(5-FC)을 기질로 사용하였을 때는 300nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 반응조건하에서 1시간 동안 1 μ M의 cytosine(5-FC)을 uracil(5-FU)로 전환하는 효소량을 1단위로 하였다.

4. 시 약

본 실험에 사용한 DEAE-cellulose (Brown, 0.91 meq/g)는 半井化學藥品株式會社(京都市)로부터 구입했으며, Sephadex G-100(fine)은 Pharmacia Fine Chemical(Uppsala)로부터 구입하여 사용했다.

Cytosine은 Yamasa 醬油株式會社(일본) 제품을, 2-thiouracil은 和光純藥株式會社 제품을, 2-thiocytosine과 2-mercaptopyrimidine은 Nakarai Chemical LTD. (Kyoto) 제품을, isocytosine, 4-amino-2, 6-dihydropyrimidine, 5-azauracil, 6-azauracil, 5-azacytosine, 6-azacytosine은 Sigma(미국) 제품을 기타 시약은 특급시약을 사용했다.

결과 및 고찰

1. Cytosine analogue의 영향

Cytosine deaminase의 활성에 미치는 cytosine analogue의 영향을 조사하기 위해 cytosine(1mM)을 기질로 하여 각 cytosine analogue를 1.0mM 및 2.0mM 되게 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켜 효소 활성을 측정하였다. Table 1에 나타낸 바와 같이 2-thiouracil, 2-thiocytosine, 6-azacytosine 및 2-mercaptopyrimidine에 의해 효소활성은 저해되었다. 이

Table 1. Effect of cytosine analogues on cytosine deaminase activity

Relative activity (%)	Cytosine analogue	
	2.0mM	1.0mM
2-Thiouracil	0.0	71.4
5-Azauracil	90.0	-
6-Azauracil	100.0	-
Isocytosine	84.0	92.3
2-Thiocytosine	0.0	23.8
5-Azacytosine	86.7	96.7
6-Azacytosine	25.6	60.7
2-Mercaptopyrimidine	0.0	38.1
4-Amino -2, 6-dihydropyrimidine	100.0	77.4
None	100.0	100.0

The enzyme activity was assayed under the standard reaction conditions in the presence of cytosine analogues at the indicated concentration and expressed as relative activity to that of the control.

는 Cihak 등^{28, 29)}이 보고한 *E. coli*의 무세포 추출액은 5-azauracil과 5-azacytosine에 의해 저해되었으며 Kream 등¹²⁾이 보고한 빵효모의 효소는 isocytosine에 의해 저해되었다는 결과와는 상이하였다.

2. 2-Thiocytosine 및 6-azacytosine의 50% 효소활성 저해농도

Cytosine deaminase에 대한 2-thiocytosine 및 6-azacytosine의 half inhibitory concentration(HI-C)을 측정하기 위하여 효소 반응계 중의 상기 cytosine analogue의 농도를 0.3mM에서 2.0mM 범위로 첨가하여 진탕수조에서 30분간 효소반응시켜 50% 효소활성 저해농도를 조사한 결과 Fig. 1에 나타난 바와 같이 2-thiocytosine, 6-azacytosine의 HIC는 각각 0.80 mM과 1.15mM로 나타났다.

3. 시간별 저해물질에 대한 cytosine deaminase 활성 변화

본 효소의 활성에 미치는 2-thiocytosine 및 6-azacytosine의 영향을 30, 60, 120, 180분의 시간별로 조사한 결과 Fig. 2에 나타낸 바와 같이 2-thiocytosine 및 6-azacytosine 첨가구가 무첨가구보다 현저한 저해를 나타내었으며 2-thiocytosine은 본 효소활성을 일정한 수준에서 반응을 정지시키지만 6-azacytosine은 반응시간에 비례하여 일정한 비율로 저해시켰다.

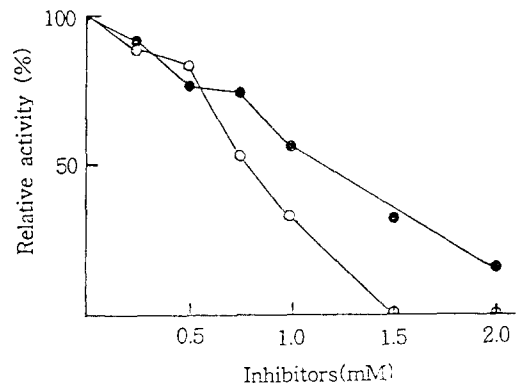


Fig. 1. Half inhibitory concentration of 2-thiocytosine and 6-azacytosine on activity of cytosine deaminase. Reaction conditions were the same as those described in the 'Materials and Methods' except that concentration of 2-thiocytosine and 6-azacytosine added was varied. The activity without of inhibitor was set at 100. ○-○ : 2-thiocytosine, ●-● : 6-azacytosine.

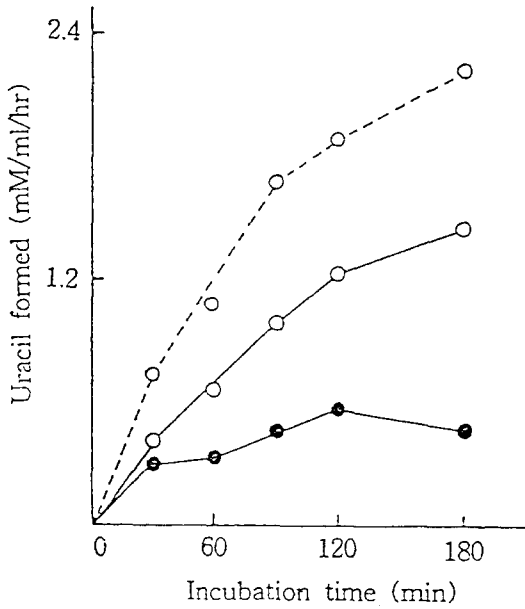


Fig. 2. Effect of the inhibitors on the activity of cytosine deaminase on incubation time. Inhibitor (1.0mM) was allowed to react with cytosine demanase for various periods of time at 37°C in 0.02 M Tris-HCl buffer of pH 6.5 and 0.05 M cytosine. ○ ---○ ; The activity of cytosine deaminase treated without the inhibitor, ○-○ ; with 6-azacytosine, ●-● ; with 2-thiocytosine.

4. 기질별 저해제의 영향

Cytosine과 5-fluorocytosine을 기질로 하여 2-thiocytosine 및 6-azacytosine의 영향을 조사해 본 결과, Table 2에 나타낸 바와 같이 기질의 종류에 관계없이 본 효소의 저해제로 작용하였으며 2-thiocytosine은 6-azacytosine보다 약 2배 정도의 높은 저해를 나타내

Table 2. Effect of the inhibitors on deamination of cytosine and 5-fluorocytosine.

Inhibitors (1 mM)	Substrates (0.75mM)	
	Cytosine	5-Fluorocytosine
2-Thiocytosine	36.5	29.0
6-Azacytosine	66.7	70.8
None	100.0	100.0

Each inhibitor was in the reaction mixture with concentration of 1 mM and 0.75mM of substrate was used. The activity without addition of inhibitor was set at 100.

었다.

5. 저해의 양상

본 효소에 대한 2-thiocytosine과 6-azacytosine의 저해양상을 검토하기 위하여 cytosine의 농도를 0.4 mM에서 2.0mM까지 조절하여 2-thiocytosine과 6-

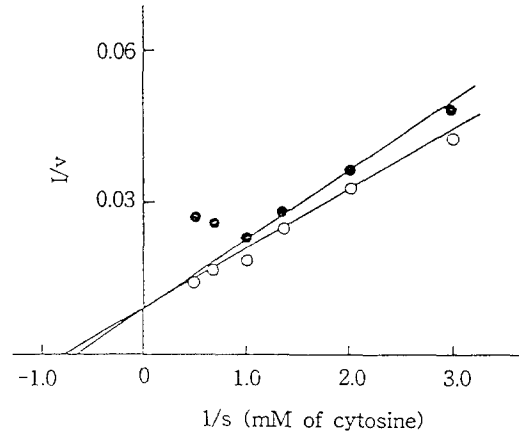


Fig. 3. Type of inhibition against cytosine deaminase by 2-thiocytosine. The enzyme activity was in assayed the presense or in the absence of 2-thiocytosine, the reaction mixture contained 0.1ml of the enzyme solution (52.8 unit/ml). Velocity (v) was expressed by the decrease of OD at 290 nm for 30 min at 37°C and substrate concentration (s) on mM of cytosine. ○-○ ; None, ●-● ; 0.5 mM 2-thiocytosine.

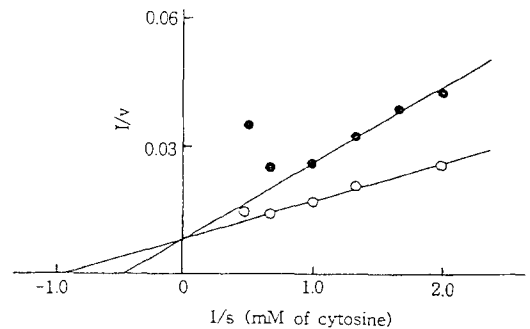


Fig. 4. Type of inhibitor against cytosine deaminase by 6-azacytosine. The enzyme activity was assayed in the presense or in the absence of 6-azacytosine. The reaction mixture contained 0.1ml of the enzyme solution (48 unit/ml). Velocity (v) was expressed by the decrease of OD at 290 nm for 30 min at 37°C and substrate concentration (s) in mM of cytosine. ○-○ ; None, ●-● ; 1 mM 6-azacytosine.

azacytosine의 최종농도를 0.5mM과 1.0mM되게 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 그 결과를 Lineweaverburk plots³⁰⁾로 나타낸 Fig. 3 및 Fig. 4는 cytosine deaminase에 대한 2-thiocytosine과 6-azacytosine의 저해형태는 V_{max} 는 불변이고 cytosine에 대한 K_m 치는 변화되므로 경쟁적 저해(competitive inhibition)임을 보여준다. *E. coli*^{28, 29)}에서는 5-azacytosine은 비길항 저해제로, 5-azauracil은 길항 저해제로 각각 작용하지만 6-azacytosine과 6-azauracil은 아무런 영향을 미치지 않았다는 보고와는 상이했다.

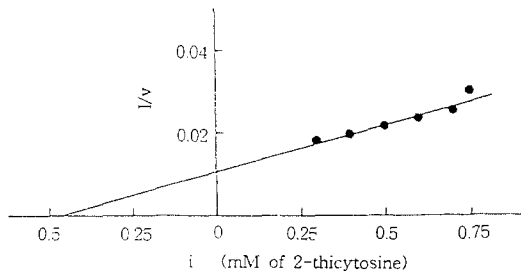


Fig. 5. Graphical determination of inhibition constant of 2-thiocytosine. Reaction condition were the same as those described in the 'Materials and Method' except that the reaction mixture contained 0.05ml of the enzyme solution (69.6 unit/ml) and varied concentration of 2-thiocytosine. Velocity (v) was expressed in mM of uracil formed in 30 min and 2-thiocytosine concentration (i) in mM.

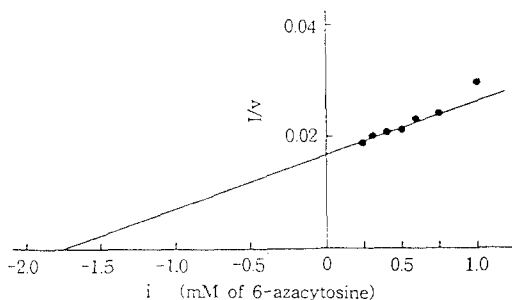


Fig. 6. Graphical determination of inhibition constant of 6-azacytosine. Reaction condition were the same as those described in the 'Materials and Method' except that the reaction mixture contained 0.1ml of the enzyme solution (49.6 unit/ml) and varied concentration of 6-azacytosine. Velocity (v) was expressed in mM of uracil formed in 30 min and 6-azacytosine concentration (i) in mM.

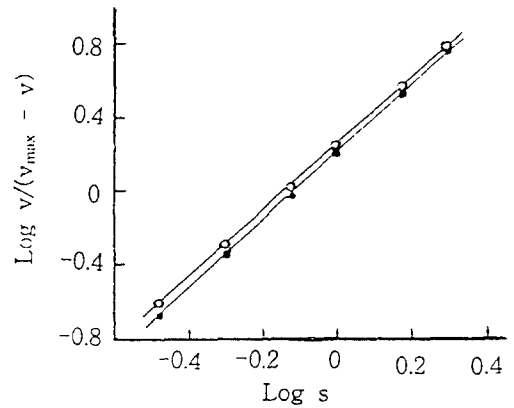


Fig. 7. Hill plots in the absence or in the presence of 2-thiocytosine. ●-● : None, ○-○ : 2-thiocytosine.

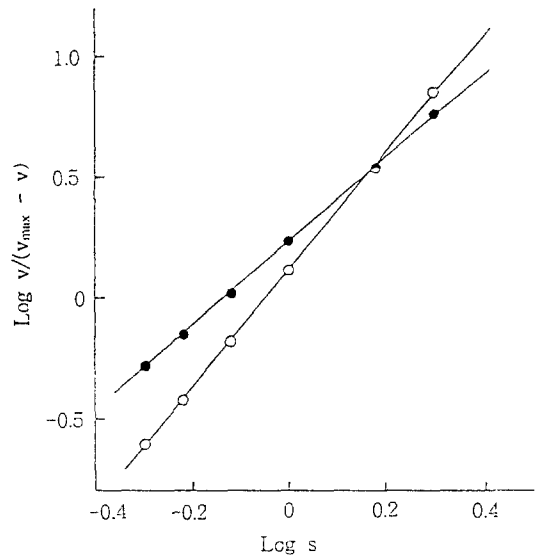


Fig. 8. Hill plots in the absence or in the presence of 6-azacytosine. ●-● : None, ○-○ : 6-azacytosine.

6. 저해 계수(K_i)

본 저해제들의 저해계수(K_i)의 값을 조사하기 위하여 2-thiocytosine과 6-azacytosine의 농도를 각각 0.3 mM에서 0.75mM까지 조절하여 37°C에서 30분간 반응시키고 그 결과를 Dixon법³¹⁾에 의해 plot하여 측정된 결과, Fig. 5 및 Fig. 6에서 보는 바와 같이 2-thiocytosine과 6-azacytosine에 대한 K_i 치는 각각 $4.5 \times 10^{-4}M$ 과 $1.75 \times 10^{-3}M$ 이었다.

7. Hill 계수(Hn)

Hill 방정식($\log v/V_{\max} - \nu = n \log S - \log K$)³²⁾ 으로부터 Hn값을 계산한 결과, Fig. 7 및 Fig. 8에서 나타낸 바와 같이 cytosine, 2-thiocytosine 및 6-azacytosine의 Hn값은 1.80, 1.81 및 2.45로 계산되었다.

요 약

Aspergillus fumigatus IFO 5840이 생산하는 cytosine deaminase에 미치는 cytosine analogue의 영향을 조사하여 다음의 결과를 얻었다.

1. Cytosine deaminase의 강한 저해를 나타내는 cytosine analogue는 2-thiouracil, 2-thiocytosine, 2-mercaptopyrimidine, 및 6-azacytosine이었다.
2. 본 효소에 대한 2-thiocytosine 및 6-azacytosine의 50% 효소활성 저해농도 (HIC)는 각각 0.80 mM과 1.15mM 이었다.
3. 2-thiocytosine은 일정한 수준에서 본 효소의 반응을 정지시키는 반면, 6-azacytosine은 반응시간에 비례하여 일정한 비율로 저해하였다.
4. 2-thiocytosine과 6-azacytosine은 cytosine이나 5-fluorocytosine의 기질 종류에 관계없이 본 효소의 저해제로 작용하였으며 2-thiocytosine이 6-azacytosine보다 약 2배 정도의 높은 저해를 나타내었다.
5. cytosine을 기질로 하였을 경우, 2-thiocytosine과 6-azacytosine에 의해 경쟁적 저해를 나타내며 이들에 대한 K_i 값은 각각 $4.5 \times 10^{-4}M$ 과 $1.756 \times 10^{-3}M$ 이었으며 cytosine, 2-thiocytosine 및 6-azacytosine에 대한 Hill 계수(Hn)는 각각 1.80, 1.81, 2.45로 나타났다.

참고문헌

1. Hahn, A. and Lintzel, W. : ber das verhalten von pyrimidin derivaten in den organismen, I. Einfluss von hefe and pyrimidinderivate, *Z. Biol.*, **79**, 179 (1923).
2. Hahn, A. and Schäfer, L. : über das verhalten von pyrimidinderivaten in den organismen, *Z. Biol.*, **83**, 511-514(1925).
3. Tatibana, M. : Interrelationship of nucleotide metabolism in mammalian tissues, *Protein, Nucleic acid and Enzyme*, **14**, 1310-1318(1969).
4. Koehlin, B. A., Rubio, F., Palmer, S., Gabriel, T. and Duschinsky, R. : The metabolism of 5-fluorocytosine-²⁻¹⁴C and of cytosine-¹⁴C in the rat and

the disposition of 5-fluorocytosine-214C in man, *Biochem. Pharmacol.*, **15**, 435-446(1966).

5. Diasco, R. B., Lakings, B. E. and Bennett, J. E. : Metabolism 5-fluorouracil in cultural cells : Protection from 5-fluorouracil cytotoxicity by purines, *Mol. Pharmacol.*, **15**, 357-366(1979).
6. 俞大植 : Pyrimidine nucleotide의 分解代謝와 細菌進化, 啓明大學校 學徒護 國團發行, **10**, 73-89(1976)
7. Sakai, T., Yu, T. S. and Omato, S. : Distribution of enzymes related to cytidine degradation in bacteria, *Agr. Biol. Chem.*, **40**, 1895(1976).
8. 유대식, 박정문 : Cytosine deaminase 결손 돌연변이주의 분리 및 배양학적 특징, 계명대 기초과학 연구소 연구논문집, **6**(1), 23-29(1987).
9. Nishiyama, T., Kawamura, Y., Kawamoto, K., Matsumura, H., Yamamoto, N., Ito, T., Ohyama, A., Katsuragi, T. and Sakai, T. : New antineoplastic chemotherapy without systemic side effects to the host, Current Chemotherapy and Immunotherapy prog. 12th Internat'l ongr. of Chemotherapy, Florence, 1269-1270(1981).
10. Nishiyama, T., Kawamura, Y., Kawamoto, K., Matsumura, H., Yamamoto, N., Ito, T., Ohyama, A., Katsuragi, T. and Sakai, T. : Antineoplastic effects of 5-fluorocytosine and cytosine deaminase on brain-tumor, *Neurol. Med. Chir.*, **22**, 344-352(1982).
11. Nishiyama, T., Kawamura, Y., Kawamoto, K., Matsumura, H., Yamamoto, N., Ito, T., Ohyama, A., Katsuragi, T. and Sakai, T. : Antineoplastic effects in rats of 5-fluorocytosine in combination with cytosine deaminase capsules, *Cancer Res.*, **45**, 1753-1761 (1985).
12. Kream, J. and Chargaff, E. : On the cytosine deaminase of yeast, *J. Amer. Chem. Soc.*, **74**, 5157-5160 (1952).
13. Ipata, P. L., Marmocchi, G., Magni, G., Felicioli, R. and Polidoro, G. : Baker's yeast cytosine deaminase. Some properties and allosteric inhibition by nucleosides and nucleotides, *Biochemistry*, **10**, 4170-4167(1971).
14. Sakai, T., Yu, T. S., Tabe, H. and Omata, S. : Purification of cytosine deaminase from *Serratia marcescens*, *Agr. Biol. Chem.*, **39**, 1623-1629 (1975a).
15. Sakai, T., Yu, T. S., Taniguchi, K. and Omata, S. : Purification of cytosine deaminase from *Pseudomonas aureofaciens*, *Agr. Biol. Chem.*, **39**, 2015-2020 (1975b).
16. Yu, T. S. : Nutritional and cultural characteristics of cytosine deaminase from *Pseudomonas aureofaciens*, 계명대 과학논문집, **3**, 97-106 (1976).
17. Yu, T. S., Sakai, T. and Omata, S. : Kinetic properties of cytosine deaminase from *Serratia marcescens*, *Agr. Biol. Chem.*, **40**, 543-549(1976a).
18. Yu, T. S., Sakai, T. and Omata, S. : Kinetic properties of cytosine deaminase from *Pseudomonas aureofaciens*, *Agr. Biol. Chem.*, **40**, 551-557(1976b).
19. West, T. P., Shanley, M. S. and O'Donovan, G. A. : Purification and some properties of cytosine deaminase from *Salmonella typhimurium*, *Biochem. Biophys. Acta.*, **719**, 251-258(1982).

20. 유대식, 이정식, 김재근 : 세포의 cytosine deaminase 생산균의 분리 및 효소생성조건, 계명대 기초과학연구소 연구논집, 7, 95-100(1988).
21. 유대식, 김대현, 박정문, 송형익, 정기택 : *Bacillus polymyxa* YL38-3의 세포의 cytosine deaminase 생성의 최적 배양조건, *한국미생물학회지*, 26, 362-367(1988a).
22. 유대식, 김대현, 박정문, 송형익, 정기택 : 세포의 cytosine deaminase의 효소학적 성질, *한국미생물학회지*, 26, 368-374(1988b).
23. 전홍기, 박정혜 : 세포의 cytosine deaminase 생산균 *Arthrobacter* sp. JH-13의 분리 및 효소 생성조건, *한국미생물학회지*, 22, 257-263(1984).
24. 이인, 박정혜, 전홍기 : *Arthrobacter* sp. JH-13이 생산하는 세포의 cytosine deaminase의 성질, *한국미생물학회지*, 23, 177-183(1985).
25. 俞大植, 金在根, 坂井拓夫, 外村健三 : 곰팡이의 cytosine deaminase에 관한 연구, *韓國産業微生物學會誌*, 14, 169-174(1986a).
26. 俞大植, 金在根, 鄭基澤 : 곰팡이성 cytosine deaminase의 활성에 미치는 溫도의 影響, *啓明大 基礎科學研究所·研究論集*, 5, 37-41(1986b).
27. 김재근 : *Aspergillus fumigatus*가 생산하는 cytosine deaminase의 정제 및 특성, 경북대학교 대학원 박사학위논문(1986).
28. Cihak, A. and Sorm, F. : Inhibition of microbial cytosine deaminase by 5-azacytosine and 5-azauracil, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 30, 2137-2139(1965).
29. Cihak, A. and Sorm, F. : Biochemical effects and metabolic transformations of 5-azacytidine in *Escherichia coli*, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 30, 2091-2101(1965).
30. Lineweaver, H. and Burk, D. : The determination of enzyme dissociation constants, *J. Amer. Chem. Soc.*, 56, 658-666(1934).
31. Dixon, M. and Webb, E. C. : Enzymes, 2nd edition, Longmans, New York, N. Y. and London, P.329(1962)
32. Segel, I. H. : Biochemical calculations, 2nd ed., John Wiley & Sons, New York, P.309-316(1975).

(1997년 2월 26일 접수)